บทที่ 3

วิธีทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลายและแบคทีเรียสำหรับวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์

3.1.1 สารละลายทริสมาลีเอตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.025 โมล/ลิตร pH 6.0

ละลายโซเดียมมาลีเอต (sodium maleate) 3.0400 กรัม และทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (trishydroxymethylaminomethane) 3.0300 กรัมในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 6 โมล/ลิตร แล้วทำปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และใช้ภายใน 2 สัปดาห์

3.1.2 สารละลายมาตรฐานมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ละลายมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ 10.00 มิลลิกรัมด้วยบัสสาวะของคนปกติจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.1.3 การเตรียมแบคทีเรียไมโครคอคคัสลูเทียส (Micrococcus luteus)

3.1.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (L-Broth) และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (LB-agar) (Luria และคณะ, 1960)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยใช้ทริพโตน (tryptone) 10 กรัม สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 10 กรัมละลายในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร แล้วทำปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นำอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดันอากาศ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เตรียมโดยนำเอาอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมไว้ข้างต้นจำนวน 1 ลิตรมาเติมแบคโต-เอก้า (bacto-agar) 15 กรัมคนให้เข้ากัน แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อทำนองเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิของสารละลายลดลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงนำมาเทใส่ในจานเพาะเชื้อ (petri dish) ที่ได้อบฆ่าเชื้อไว้แล้วจานละประมาณ 20 มิลลิลิตร การเทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในจานเพาะเชื้อทำในสภาพปราศจากเชื้อ (sterile condition) ทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อนี้ไปอินคิวเบท (incubate) ในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน ถ้าไม่ปรากฏว่ามีจุลชีพใด ๆ เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ จึงจะนำจานเพาะเชื้อนี้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.3.2 <u>การเลี้ยงแบคทีเรียไมโครคอคคัสลูเทียส</u>

การเลี้ยงแบคทีเรียทำในสภาพปราศจากเชื้อ โดยนำแบคทีเรียไมโครคอคคัสลูเทียสซึ่งซื้อจากบริษัท Syva (หนักหลอดละประมาณ 75 มิลลิกรัม) มาหนึ่งหลอด เช็ดภายนอกหลอดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ (70%) ใช้ลวดรูปบ่วง (loop) ที่ปราศจากเชื้อแตะไมโครคอคคัสลูเทียสที่อยู่ในหลอด แล้วจุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (จากข้อ 3.1.3.1) ที่มีปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงใช้ลวดรูปบ่วงจุ่มลงในสารแขวนลอยของแบคทีเรียนี้ แล้วนำมาสตรีค (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้แล้ว (จากข้อ 3.1.3.1) แล้วนำไปอินคิวเบทในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะสังเกตุเห็นไมโครคอคคัสลูเทียสเจริญขึ้นเป็นโคโลนี (colony) สีเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในจานเพาะเชื้อ จึงเตรียมเชื้อตั้งต้นโดยเขี่ยไมโครคอคคัสลูเทียส 2 โคโลนีจากจานเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 200 มิลลิลิตรในขวด (Erlenmayer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร เตรียมทั้งหมด 2 ขวด นำไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในเครื่องเขย่า (shaking water bath) เป็นเวลาประมาณ 14 ชั่วโมง

นำเชื้อตั้งต้นที่เตรียมไว้นี้ทั้งหมด 400 มิลลิลิตรใส่ลงในเครื่องหมัก (fermenter) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอยู่ 3,600 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนสารละลายแขวนลอยของเซลล์ด้วยความเร็ว 400 รอบ/นาที และมีความดันอากาศ 2.5 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร ที่เวลาเริ่มต้น สารละลายแขวนลอยนี้มีความขุ่นซึ่งมีความสามารถในการดูดกลืนแสง (absorbance)

ประมาณ 0.10 ที่ความยาวคลื่นแสง 430 นาโนเมตร บันทึกความขุ่นที่เพิ่มขึ้นโดยการอ่านค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงทุกชั่วโมง เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของไมโครคอคคัสลูเทียส เมื่อเลี้ยงได้ 11 ชั่วโมงซึ่งเป็นระยะที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตเต็มที่ จึงเก็บเซลล์โดยนำสารละลายแขวนลอยทั้งหมดนี้ไปปั่นแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่น (Beckman refrigerated centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยทริสมาลีเอตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) ครั้งละประมาณ 1,000 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส แล้วทำให้แห้งขณะแข็งในเครื่องไลโอฟิไลเซอร์ (lyophilizer) เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง เก็บไมโครคอคคัสลูเทียสไว้ในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ต่อไป

3.1.3.3 <u>การเตรียมสารละลายแขวนลอยของไมโครคอคคัสลูเทียสสำหรับใช้ในเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์</u>

วิธีการเตรียมทำตามวิธีของบริษัท Syva โดยนำไมโครคอคคัสลูเทียส (จากข้อ 3.1.3.2) 80 มิลลิกรัมมาเติมทริสมาลีเอตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) 100 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายแขวนลอยนี้ผสมเข้ากันดี แล้วจึงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 12 ชั่วโมงก่อนที่จะนำไปใช้ ซึ่งสามารถเก็บสารละลายแขวนลอยนี้ไว้ใช้ได้ภายใน 1 สัปดาห์

3.1.4 <u>การเตรียมมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต</u>

มอร์ฟีนประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซี (hydroxyl group) อยู่ 2 หมู่ คือหมู่ที่เป็นฟีโนลิค (phenolic-OH) ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่งที่ 3 ของโมเลกุล และหมู่ที่เป็นแอลกอฮอลิค (alcoholic-OH) ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่งที่ 6 ของโมเลกุล แต่หมู่ไฮดรอกซีทั้งสองนี้ไม่สามารถเชื่อมกับโมเลกุลของโปรตีนได้โดยตรง จึงต้องเปลี่ยนมอร์ฟีนให้อยู่ในรูปของคาร์บอกซีเมทิลมอร์ฟีน (carboxymethylmorphine) ซึ่งทำให้มีหมู่คาร์บอกซีลิค (carboxylic group) ที่ตำแหน่งที่ 3 (Rubenstein และคณะ 1972; Rowley และคณะ, 1975) หรืออาจเตรียมให้อยู่ในรูปของมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต (morphine-6-hemisuccinate) ซึ่งทำให้มีหมู่คาร์บอกซีลิคที่ตำแหน่งที่ 6 ก็ได้ (Wainer และคณะ 1972; Simon และคณะ 1972) หมู่คาร์บอกซีลิคนี้สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของไลซีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ได้ และเกิดเป็นพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้เกิดได้โดยใช้วิธีมิกซ์แอนไฮไดรด์

(mixed anhydride method) (Vaughan, 1951) ดังแสดงในรูปที่ 8 หน้า 29 การเตรียมมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตมี 2 ขั้นตอนคือ

3.1.4.1 <u>การเตรียมมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต</u>

เนื่องจากมอร์ฟีนที่ซื้อมาอยู่ในรูปของมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ จึงจำเป็นต้อง กำจัดไฮโดรคลอไรด์ออกไปก่อน โดยดัดแปลงวิธีของ Wainer และคณะ (1972); Simon และคณะ (1972) โดยละลายมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ 3.0 กรัมในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยผลึกโซเดียมไบคาร์บอเนตหรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมล/ลิตร กรองและล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 30 มิลลิลิตร 3 ครั้ง นำตะกอนที่ได้ไปอบให้แห้งในเดสซิเคเตอร์สูญญากาศ (heated vacuum desiccator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ผงสีขาวของมอร์ฟีน นำมอร์ฟีนที่ได้มาเตรียมมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต โดยดัดแปลงวิธีของ Wainer 1972 โดยใช้มอร์ฟีน 0.8560 กรัมและซัคซินิคแอนไฮไดรด์ (succinic anhydride) 0.9000 กรัม ละลายในไพริดีน (pyridine) 20 มิลลิลิตร และให้ทำปฏิกิริยากันโดยรีฟลักซ์ (reflux) เป็นเวลาประมาณ 4½ ชั่วโมง แล้วระเหยสารละลายที่เหลืออยู่ โดยใช้เครื่องระเหยความดันต่ำ (rotary evaporator) จะได้สารสีขาว นำสารที่ได้มาล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ (90%) ที่ร้อนประมาณ 40 องศาเซลเซียสครั้งละ 20 มิลลิลิตร 3 ครั้ง นำตะกอนที่ได้มาตกผลึก 2 ครั้งด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ (60%) โดยละลายตะกอนที่ได้ทั้งหมดในเอทิลแอลกอฮอล์ (60% อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส) 130 มิลลิลิตร กรองสารละลายในขณะร้อนด้วยกระดาษกรอง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึกที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 26 องศาเซลเซียส) ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง นำผลึกที่ได้ไปอบให้แห้งในเดสซิเคเตอร์สูญญากาศที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บผลึกมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตที่ได้ไว้ในขวดที่มีฝาปิดสนิท และใส่ไว้ในเดสซิเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้อง

ก่อนที่จะนำผลึกมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตไปใช้สำหรับการเตรียมมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตต่อไป จะต้องนำไปทดสอบความบริสุทธิ์ก่อนโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดผิวบาง (ตามวิธีในข้อ 3 ของภาคผนวก) และหาจุดหลอมเหลวของผลึกมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต โดยใช้เครื่องมือสำหรับหาจุดหลอมเหลว (Fisher-Johns melting point apparatus) และพิสูจน์สูตรโครงสร้างของโมเลกุลของมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตโดยใช้วิธีอุลตราไวโอเลตสเปคโตรสโคปี (ultraviolet spectroscopy) อินฟาเรดสเปคโตรสโคปี (infared

spectroscopy) นิวเคลียแมคเนติครีโซแนนสเปคโตรสโคปี (nuclear magnetic resonance spectroscopy) และแมสสเปคโตรสโคปี (mass spectroscopy) และทดสอบหมู่ไฮดรอกซีที่เป็นฟีโนลิคด้วยโฟลินฟีนอลรีเอเยนต์ (Folin phenol reagent) ดังรายละเอียดในข้อ 2 ของภาคผนวก

3.1.4.2 <u>การคอนจูเกตมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตกับไลโซไซม์</u>

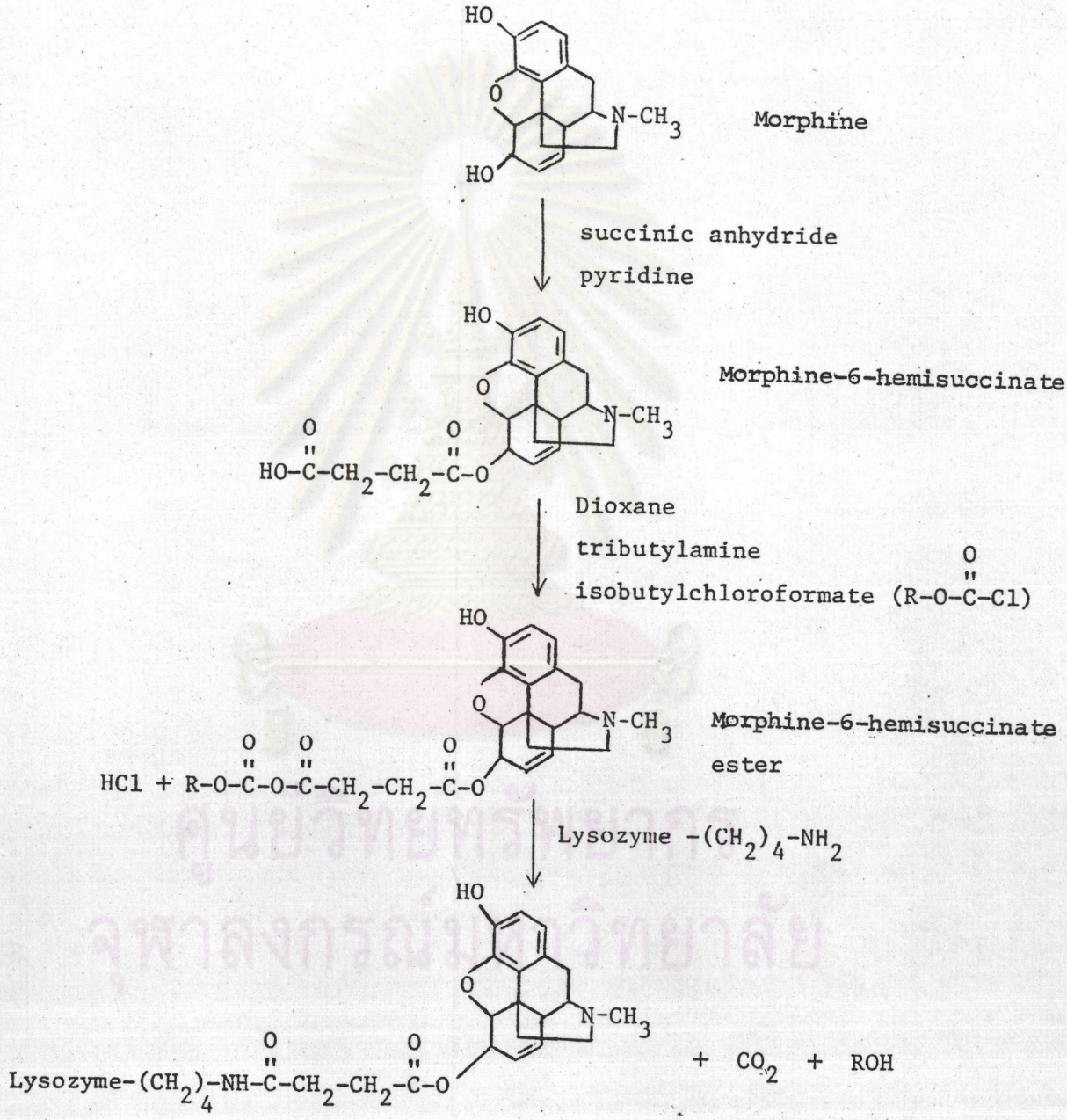
การคอนจูเกตมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตกับไลโซไซม์ทำได้โดยดัดแปลงวิธีของ Wainer (1972)

<u>สารละลาย ก.</u> นำมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนต (จากข้อ 3.1.4.1) มา 0.0143 กรัม ละลายในไดออกเซน 1.25 มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาด 1.3x10 เซนติเมตร แล้วนำไปแช่ในอ่างที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมไอโซบิวทิลคลอโรฟอร์เมท (isobutylchloroformate) 10 ไมโครลิตร และไตรบิวทิลลามิน (tributylamine) 20 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 ชั่วโมง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสอีก 13 ชั่วโมง

<u>สารละลาย ข.</u> ละลายไลโซไซม์ 0.0646 กรัมในน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ขนาด 30 มิลลิลิตร แล้วจึงค่อย ๆ เติมไดออกเซนลงไป 4 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร นำสารละลายที่ได้ไปตั้งไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 30 นาที

เติมสารละลาย ก. ลงในสารละลาย ข. พร้อมทั้งคนตลอดเวลาด้วยเครื่องคนด้วยแม่เหล็ก (magnetic stirror) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร เพื่อรักษาอัตราส่วนน้ำกลั่น:ไดออกเซนให้เป็น 1:1 จะสังเกตุเห็นฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้น ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 8.5 อีกครั้งด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร หลังจากนั้นคนสารละลายนี้ต่อไปอีกเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

รูปที่ 8 ปฏิกิริยาการเกิดมอร์ฟีน-6-เฮมิซัคซิเนตและมอร์ฟีน-ไลโซไซน์คอนจูเกต โดยดัดแปลงจากวิธีของ Spector และ Parker (1972)



Morphine-lysozyme conjugate

3.1.5 การทำมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตให้บริสุทธิ์โดยการไดอะไลซิส

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.1.4.2 มา 11 มิลลิลิตร ใส่ในถุงไดอะไลซิส (dialysis tubing) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.6 เซนติเมตร แล้วนำไปไดอะไลส์ในทริส-มาลีเอตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) จำนวน 2 ลิตรพร้อมทั้งคนด้วยเครื่องคนด้วยแม่เหล็กตลอดเวลาประมาณ 36 ชั่วโมงโดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 6 ครั้ง

3.1.6 การทำมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตให้บริสุทธิ์โดยการใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50

นำสารละลายทั้งหมดที่ได้จากข้อ 3.1.5 ไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (Beckman refrigerated centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสจำนวน 10 มิลลิลิตร มาเติมลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-50 (จากข้อ 4 ของภาคผนวก) ชะคอลัมน์ด้วยทริสมาลีเอตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ไว้เป็นลำดับส่วนในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตรจำนวน 170 หลอด นำแต่ละหลอดไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร (OD_{280}) แล้วเขียนกราฟระหว่างความสามารถในการดูดกลืนแสงกับปริมาตรของสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ จะปรากฏพีค (peak) ของการดูดกลืนแสงเพียงพีคเดียว และอยู่ระหว่างหลอดที่ 120 ถึง 155 จึงรวมสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ตั้งแต่หลอดที่ 120 ถึง 155 สำหรับการทดลองต่อไป

3.1.7 การทำมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตให้แห้ง

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.1.6 ไปแช่ให้แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำให้แห้งขณะแข็งในเครื่องไลโอฟิไลเซอร์นานประมาณ 18 ชั่วโมง จะได้มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตมีลักษณะเป็นผงสีขาว เก็บในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิทที่ 4 องศาเซลเซียส

3.1.8 การเตรียมสารละลายมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตสำหรับใช้ในเอนไซม์มัลติ-ไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์

ละลายมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต (จากข้อ 3.1.7) 2.5 มิลลิกรัม ในทริสมาลีเอตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1) 2.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 180 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (วัดโดยวิธีของ Lowry ตามข้อ 1.2 ของภาคผนวก)

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์

วิธีการวิเคราะห์ทำตามวิธีของบริษัท Syva โดยตวงสารละลายต่าง ๆ ตามลำดับที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.0x5.0 เซนติเมตร จนถึงแอนติบอดีต่อมอร์ฟีน เขย่าสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นจึงเติมมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต เขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วเริ่มจับเวลาทันที วัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 436 นาโนเมตร ที่เวลา 10 วินาที และ 50 วินาทีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Beckman clinical spectrophotometer) ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37±0.1 องศาเซลเซียส คำนวณหาแอคติวิตีของไลโซไซม์ได้จากความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ลดลงในช่วงเวลา 40 วินาที ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้หน่วยแอคติวิตีของไลโซไซม์คูณด้วย 1,000 (ΔOD_{436}/40 วินาที)x 1,000 (Schneider และคณะ, 1973) เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นมอร์ฟีนมาตรฐานกับแอคติวิตีของไลโซไซม์ ปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนที่มีอยู่ในตัวอย่างปัสสาวะสามารถวัดได้โดยนำค่าแอคติวิตีของไลโซไซม์มาอ่านค่าความเข้มข้นของมอร์ฟีนจากกราฟมาตรฐานนี้ สำหรับหลอดที่เป็นแบลงค์คือ หลอดที่เตรียมไว้เพื่อทดสอบว่ามีไลโซไซม์ในตัวอย่างปัสสาวะ (endogeneous lysozyme) หรือไม่ ซึ่งจะนำแอคติวิตีที่วัดได้จากหลอดที่เป็นแบลงค์หักออกจากแอคติวิตีที่วัดได้ในหลอดตัวอย่าง (Schneider และคณะ, 1973)

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์มอร์ฟีนด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	
	หลอดตัวอย่าง	หลอดที่เป็นแบลงค์
ทริสมาลีเอตบัฟเฟอร์ (0.025 โมล/ลิตร pH 6.0)	750	850
ไมโครคอคคัสลูเทียส (จากข้อ 3.1.3.3)	200	200
สารละลายมาตรฐานมอร์ฟีน (0,9,15,25,45 ng) หรือตัวอย่างปัสสาวะ	50	50
แอนติบอดีต่อมอร์ฟีน (จากบริษัท Syva)	50	-
มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต (จากข้อ 3.1.8)	50	-

3.3 การวัดแอคติวิตีของไลโซไซม์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต เมื่อมีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีน

ตวงสารละลายต่าง ๆ ตามลำดับดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2 ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.0x5.0 เซนติเมตร แล้ววัดแอคติวิตีของไลโซไซม์เช่นเดียวกับในข้อ 3.2

ตารางที่ 2 การทดสอบแอคติวิตีของไลโซไซม์ที่อยู่ในรูปของมอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกตระหว่างหลอดที่มีและไม่มีแอนติบอดีต่อมอร์ฟีน

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	
	หลอดที่ไม่มี Ab	หลอดที่มี Ab
ทริสมาลีเอตบัฟเฟอร์ (0.025 โมล/ลิตร, pH 6.0)	850	800
ไมโครคอคคัสลูเทียส (จากข้อ 3.1.3.3)	200	200
แอนติบอดีต่อมอร์ฟีน (จากบริษัท Syva)	-	50
มอร์ฟีน-ไลโซไซม์คอนจูเกต (4.5,6.0, 9.0 ไมโครกรัม)	50	50

3.4 การศึกษาความไว ความแม่นยำและความถูกต้องของการวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในบัสสาวะโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์

3.4.1 ความไว (Sensitivity)

ความไวของวิธีวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนโดยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์หาได้โดยทำการวัดปริมาณมอร์ฟีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0 ถึง 135 นาโนกรัม ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 5 หลอด (5 replicates) แล้วหาความไวของวิธีวัดตามวิธีของ Brattin และ Sunshine (1974) โดยการใช้สติวเดนส์ทีเทส (Student's t test) ทดสอบความแตกต่างระหว่างแอคติวิตีเมื่อมีและไม่มีมอร์ฟีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาตรฐานที่ทำให้แอคติวิตีของไลโซไซม์แตกต่างจากหลอดที่ไม่มีมอร์ฟีนมาตรฐาน โดยใช้ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่าความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาตรฐานนั้นเป็นความไวของวิธีวัด

3.4.2 ความแม่นยำ (Precision)

3.4.2.1 การเตรียมตัวอย่างบัสสาวะสำหรับใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพ (quality control)

นำตัวอย่างบัสสาวะของชาวไทยภูเขาที่ใช้และติดผื่นมาเจือจางด้วยบัสสาวะของคนปกติให้ได้ตัวอย่างบัสสาวะที่มีความเข้มข้นของอนุพันธ์มอร์ฟีน 2 ความเข้มข้นคือ ความเข้มข้นต่ำและสูง แบ่งตัวอย่างบัสสาวะที่เตียมไว้นี้ใส่หลอดทดลองขนาด 0.4x4.0 เซนติเมตรหลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับเป็นตัวควบคุมคุณภาพของแต่ละการทดลองต่อไป นำบัสสาวะที่เตรียม 2 ตัวอย่างมาศึกษาความแม่นยำของวิธีวัดดังต่อไปนี้

3.4.2.2 ความแม่นยำในการทดลองเดียวกัน (Within assay precision)

วัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในบัสสาวะที่มีความเข้มข้นอนุพันธ์มอร์ฟีนต่ำและสูง (จากข้อ 3.4.2.1) ด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ตามวิธีข้อ 3.2 หน้า 31 โดยทำซ้ำกัน ตัวอย่างละ 10 ซ้ำในการทดลองเดียวกัน แล้วคำนวณหาความแม่นยำเป็นร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

3.4.2.3 ความแม่นยำระหว่างการทดลอง (Between assay precision)

วัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนในบัสสาวะที่มีความเข้มข้นอนุพันธ์มอร์ฟีนต่ำและสูง (จากข้อ 3.4.2.1) ด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ตามวิธีข้อ 3.2 หน้า 31 โดยทำซ้ำกันตัวอย่างละ 6 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งทำต่างการทดลองกัน แล้วคำนวณหาความแม่นยำเป็นร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation; %CV) คำนวณได้จากสูตร

$$\%CV = \frac{\text{Standard deviation} \times 100}{\text{Mean}}$$

3.4.3 <u>ความถูกต้อง</u> (Accuracy)

นำตัวอย่างปัสสาวะที่มีความเข้มเข้นอนุพันธ์มอร์ฟีนต่ำมาเติมมอร์ฟีนมาตรฐาน 100,200,400,500 นาโนกรัม/มิลลิลิตรปัสสาวะ แล้วนำแต่ละตัวอย่างไปวัดปริมาณอนุพันธ์มอร์ฟีนด้วยวิธีเอนไซม์มัลติไพลด์อิมมิวโนแอสเสย์ตามวิธีข้อ 3.2 หน้า 31 แล้วคำนวณหา % recovery และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ปริมาณมอร์ฟีนที่วัดได้}}{\text{ปริมาณมอร์ฟีนที่มีอยู่จริง}} \times 100$$

$$\text{Correlation coefficient } (\gamma) = \frac{n\Sigma X_i Y_i - (\Sigma X_i)(\Sigma Y_i)}{\sqrt{n\Sigma X_i^2 - (\Sigma X_i)^2}\sqrt{n\Sigma Y_i^2 - (\Sigma Y_i)^2}}$$

γ = สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

X_i = ปริมาณมอร์ฟีนที่มีอยู่จริง

Y_i = ปริมาณมอร์ฟีนที่วัดได้

n = จำนวนครั้งของความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาตรฐานที่เติมในปัสสาวะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย